PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/41811 C07H 21/00 A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. December 1996 (27.12.96) (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/02459

(30) Prioritätsdaten:

195 20 398.4 195 37 985.3

(22) Internationales Anmeldedatum:

8. Juni 1995 (08.06.95)

DE 12. Oktober 1995 (12.10.95) DE

6. Juni 1996 (06.06.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Unterholzstrasse 22, D-82377 Penzberg (DE). WALTER, Thomas [DE/DE]; Alte Tölzer Strasse 10, D-83673 Bichl (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE). LESNIAK, Christoph [DE/DE]; Mühlenstrasse 20, D-66111 Saarbrücken (DE). MENNIG, Martin [DE/DE]; Mittelstrasse 5, D-66895 Quierschied (DE). RIEDLING, Michael [DE/DE]; Albertstrasse 9, D-66125 Saarbrücken (DE). SCHMIDT, Helmut [DE/DE]; Im Königsfeld 29, D-66130 Saarbrücken (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: MAGNETIC PIGMENT

(54) Bezeichnung: MAGNETISCHES PIGMENT

(57) Abstract

Magnetic particles have a substantially pore-free outer glass surface, or an outer glass surface with pores having less than 10 nm diameter. Ferromagnetic particles with a glass surface are preferably used to isolate biological materials from samples. They ensure a rapid and reliable purification.

(57) Zusammenfassung

Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist sowie ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, sind bevorzugt einsetzbar bei der Isolierung von biologischen Materialien aus Proben. Sie gewähren eine rasche und zuverlässige Reinigung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	A				
AT	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich		
AU	Osterreich	GE	Georgien	MX	Mexiko
BB	Australien	GN	Guinea	NE	Niger
	Barbados	GR	Griechenland	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	IE	Irland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	īr	Italien	PL	Polen
BJ	Benin	JР		PT	Portugal
BR	Brasilien	KE	Japan	RO	Rumānien
BY	Belarus	KG	Kenya	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	KP	Kirgisistan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Demokratische Volksrepublik Korea	SE ·	Schweden
CG	Kongo	KZ.	Republik Korea	SG	Singapur
CH	Schweiz	LI	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire		Liechtenstein	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CS	Tschechoslowakei	LK	Litanen	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	LU	Luxemburg	TG	
DE	Deutschland	LV	Lettland	TJ	Togo
DK	Dānemark	MC	Monaco	TT	Tadschikistan
ER	Estland	MD	Republik Moldau	UA.	Trinidad und Tobago
ES	Spanien	MG	Madagaskar	UG	Ukraine
FI	Finnland	ML	Mali		Uganda
FR	Frankreich	MN	Mongolei	US	Vereinigte Staaten von Amerik
GA	Gabon	MR	Mauretanien	UZ	Usbekistan
or.	Gaoon	MW	Malawi	VN	Vietnam

WO 96/41811 PCT/EP96/02459

Magnetisches Pigment

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Reinigung eines biologischen Materials, insbesondere von Nukleinsäuren unter Verwendung von Glaspartikeln in Gegenwart chaotroper Salze, Verfahren zur Isolierung dieser biologischen Materialien und Verfahren zur Konzentrierung biologischen Materialien und die Überführung von biologischen Materialien aus Lösungen mit hoher Konzentration an Salzen in Lösungen mit niedriger Konzentration an Salzen.

Manche biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, stellen im Hinblick auf ihre Isolierung aus der natürlichen Umgebung besondere Anforderungen. Zum einen sind sie oft in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und zum anderen befinden sie sich oft in Nachbarschaft vieler anderer fester und gelöster Substanzen, die ihre Isolierung, beziehungsweise Bestimmung, beeinträchtigen.

In jüngerer Zeit hat es daher nicht an Versuchen gefehlt, Verfahren und Materialien zur Isolierung von Nukleinsäuren aus ihrer natürlichen Umgebung vorzuschlagen. Aus Proc. Natl. Acad. USA 76, 615 - 619 (1979) ist die Bindung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen in Gegenwart von Natriumjodid in gemahlenem Flintglas beschrieben.

In Anal. Biochem. 121, 382 - 387 (1982) ist die Reinigung von Plasmid DNA aus Bakterien an Glasstaub in Gegenwart von Natriumperchlorat beschrieben.

In DE-A 37 34 442 ist die Isolierung von einzelsträngiger M13 Phagen-DNA an Glasfaserfiltern durch Ausfällung der Phagenpartikel mit Hilfe von Essigsäure und Lyse der Phagenpartikel mit Perchlorat beschrieben. Die an die Glasfaserfilter gebundenen Nukleinsäuren werden nach Waschen mit einem methanolhaltigen Puffer in Tris/EDTA-Puffer eluiert.

In Anal. Biochem. 175, 196- 201 (1988) ist ein ähnliches Verfahren zur Reinigung von DNA aus Lambdaphagen beschrieben.

Den bisher genannten Verfahren des Standes der Technik ist die selektive Bindung von Nukleinsäuren an Glasoberflächen in chaotropen Salzlösungen gemeinsam, wobei die Nukleinsäure von Verunreinigungen wie Agarose, Proteinen oder Zelltrümmern abgetrennt wird. Zur Separierung der Glaspartikel von den Verunreinigungen wird nach dem Stand der Technik entweder Zentrifugation von Partikeln oder Durchsaugen von Flüssigkeiten durch Glasfaserfilter verwendet. Hierbei handelt es sich jedoch um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung großer Probenzahlen stark behindert.

In Anal. Biochem. 201, 166 - 169 (1992) bzw. PCT GB 91/00212 ist die Verwendung von Magnetpartikeln zur Immobilisierung von Nukleinsäuren nach Ausfällung durch Zugabe von Salz und Ethanol beschrieben. Hierbei findet eine Agglutination der Nukleinsäuren unter Einschluß der Magnetpartikel statt. Das Agglutinat wird von dem ursprünglichen Lösungsmittel durch Anlegen eines Magnetfeldes und Waschen getrennt. Nach einem Waschschritt werden die Nukleinsäuren in einem Trispuffer gelöst. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die Ausfällung nicht selektiv für Nukleinsäuren ist, sondern eine Vielzahl von festen und gelösten Stoffe mitagglutiniert werden. So ist es durch dieses Verfahren nicht möglich, eventuell vorhandene Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen in ausreichendem Maße zu entfernen

In US-A-4,233,169 ist ein poröses Glas beschrieben, das Magnetpartikel eingelagert enthält.

Auf dem Markt befindet sich derzeit auch sogenanntes magnetisches, poröses Glas, welches Magnetpartikelchen in einer porösen, partikulären Glasmatrix enthält, und wobei die Oberfläche von einer streptavidinhaltigen Schicht überzogen ist. Dieses Produkt kann zur Isolierung von biologischen Materialien, zum Beispiel Proteinen oder Nukleinsäuren verwendet werden, wenn diese in einem aufwendigen Vorbereitungsschritt so modifiziert werden, daß diese kovalent an Biotin gebunden sind.

Aufgabe der Erfindung war es, bessere Materialien zur Immobilisierung von biologischen Materialien und ein einfaches und für die Routine-Diagnostik geeignetes Verfahren zur Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Ein weiterer Gegenstand sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Isolierung biologischer Materialien, insbesondere von Nukleinsäuren, sowie Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel.

Als Partikel bezeichnet der Fachmann feste Materialien mit einem geringen Durchmesser. Manchmal bezeichnet man solche Partikel auch als Pigmente. Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind besonders Partikel geeignet, die eine durchschnittliche Korngröße von weniger als 100 μ m haben. Besonders bevorzugt weisen sie eine durchschnittliche Korngröße von zwischen 10 und 60 μ m auf. Bevorzugt ist die Korngrößenverteilung relativ homogen, insbesondere liegen nahezu keine Teilchen < 10μ m oder > 60μ m vor.

Als magnetisch werden Materialien bezeichnet, die durch einen Magnet angezogen werden können, d. h. beispielsweise ferromagnetische oder superparamagnetische Materialien. Als magnetisch werden auch Materialien verstanden, die als weich magnetische Materialien bezeichnet werden, z. B. Ferrite. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind ferromagnetische Materialien, insbesondere wenn sie noch nicht vormagnetisiert wurden. Unter Vormagnetisierung ist in diesem Zusammenhang das Inkontaktbringen mit einem Magneten zu verstehen, wodurch die Remanenz erhöht wird. Besonders bevorzugt sind ferromagnetische Materialien, wie z. B. Magnetit (Fe₃O₄) oder Fe₂O₃.

Unter einer äußeren Oberfläche eines Partikels wird die zusammenhängende Oberfläche verstanden, von der in Richtung auf die Umgebung des Partikels Senkrechte gebildet werden können, die dasselbe Partikel nicht noch einmal schneiden

Unter eine Pore wird eine Ausnehmung in der äußeren Oberfläche des Partikels verstanden, bei denen die Oberfläche soweit in das Partikel hineinreicht, daß eine in der Ausnehmung auf der Oberfläche gebildete gedachte Senkrechte in Richtung auf die nächstliegende Umgebung des Partikels das Partikel mindestens 1 mal schneidet. Poren reichen außerdem tiefer als ein Radius der Pore in das Partikel hinein.

Unter einem Glas im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein siliciumhaltiges amorphes Material verstanden. Das Glas kann weitere Materialien enthaltenen, z. B.

B_2O_3	(0 - 30 %),
Al_2O_3	(0 - 20 %),
CaO	(0 - 20 %),
BaO	(0 - 10 %),
K ₂ O	(0 - 20 %),
N ₂ O	(0 - 20 %),
MgO	(0 - 18 %),
Pb_2O_3	(0 - 15 %).

In geringerem Umfang von 0 - 5 % können auch eine Vielzahl anderer Oxide, wie z. B. Mn₂O₃, TiO₂, As₂O₃, Fe₂O₃, CuO, CoO usw. enthalten sein. Als besonders wirksam haben sich Oberflächen einer Zusammensetzung von Borsilikatglas, Flintglas oder Silica erwiesen. Unter dem Gesichtspunkt der Ausbeute an Nukleinsäuren besonders bevorzugte Borsilikatgläser haben einen Boroxidgehalt von mehr als 25 %; als besonders wertvoll wurde ein Glas der Zusammensetzung SiO₂/B₂O₃ 70/30 erkannt. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Gläser, die durch den sogenannten Gel-Solprozeß und anschließendes Trocknen und Verdichten der gebildeten Schicht gebildet werden. Dieser Prozeß ist in seinen Grundzügen bekannt und wurde z.B. in C.J. Brinker, G.W. Scherer "Sol Gel science - The physics and chemistry of Sol Gel Processing", Academic Press Inc. 1990 und Sol-Gel Optics, Processing and Applications Lisa C. Klein Ed. Kluwer Academic Publishers 1994, Seite 450 ff. sowie in DE-A-1941191, DE-A-3719339, DE-A-4117041 und DE-A-4217432 beschrieben. Er wurde allerdings bisher noch nicht für magnetische Partikel beschrieben. Daß hiermit magnetische Partikel erzeugt werden können, die bei der Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, ganz überraschende Eigenschaften haben, war nicht zu erwarten. Im Gel-Sol-Prozeß werden Alkoxide von netzwerksbildenden Komponenten, z. B. Si02, B2O3, Al2O3, TiO2, ZrO2, GeO2 zusammen mit Oxiden und Salzen anderer Komponenten, z. B. in alkoholischer Lösung, vorgelegt und hydrolysiert. In der Gleichung ist die Herstellung von einem Natriumboroaluminiumsilikatglas aufgeführt.

NaOH +
$$B_2O_3$$
 + $Al(OR)_3$ + $Si(OR)_4$ $\frac{+H2O}{-ROH}$

NaOH + B_2O_3 + $$ + $$ \longrightarrow

$$\begin{array}{c} \longrightarrow & \begin{bmatrix} OH \\ I \\ B\text{-O-Al-Si-OH} \\ O-\\ Na+ \end{bmatrix} \\ \hline T \\ \longrightarrow & (Na_2O\cdot B_2O_3\cdot Al_2O_3\cdot SiO_2)_{Glas} \end{array}$$

Durch die Zugabe von Wasser wird der Hydrolyseprozeß der Ausgangskomponenten in Gang gesetzt. Die Reaktion verläuft relativ rasch, da die Alkaliionen katalytisch auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Kieselsäureesters einwirken. Nach Ablauf der Gelbildung kann das entstehende Gel getrocknet und durch einen thermischen Prozeß zu einem Glas verdichtet werden.

Das Mengenverhältnis Sol/Pigment hat einen erheblichen Einfluß auf die Ausbeute an erfindungsgemäßen magnetischen Pigment. Grenzen sind dadurch gegeben, daß der Pigmentanteil so gering ist, daß eine noch pump- und sprühfähige Masse entsteht. Bei zu geringem Pigmentanteil wird der Feinanteil, z. B. von nicht-magnetischem Material zu groß und stört. Als im Hinblick auf die Pigmentausbeute zweckmäßige Mengenverhältnisse wurden 10 bis 25 g Pigment/100 ml Sol gefunden.

Die Aufschlämmung wird zur Entstehung eines Pulvers bevorzugt durch eine Düse versprüht und das Aerosol auf einer Fallstrecke getrocknet. Die Düse wird bevorzugt geheizt, um die Trocknung der Aufschlämmung zu beschleunigen. Abhängig von der Geometrie der Düse beträgt die Düsentemperatur bevorzugt ca. 120 bis 200°C. Ein Kompromiß wird gefunden durch ausreichende Verdampfungsgeschwindigkeit, jedoch Vermeiden von Verspritzen.

Im Hinblick auf die Ausbeute ist die Verdichtungstemperatur möglichst hoch zu wählen. Ist sie jedoch zu hoch, verkleben die Partikel untereinander und es bilden sich Agglomerate, die herausgesiebt werden sollten. Die Nachbehandlung unter Luft führt bei zu hohen Temperaturen zu einem Verlust der magnetischen Eigenschaften, weshalb zu hohe Temperaturen vermieden werden sollten.

Unter einer im wesentlichen porenfreien Oberfläche wird eine Oberfläche verstanden, die zu weniger als 5 %, bevorzugt weniger als 2 %, besonders bevorzugt weniger als 0.1 %, mit

Poren der oben stehenden Definition durchsetzt ist. Sollten Poren vorhanden sein, so haben diese bevorzugt einen Durchmesser von weniger als 10, besonders bevorzugt 1 nm.

Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Partikel, die einen Kern aus mit TiO₂ beschichteten Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei der so gebildete Verbundstoff von der Glasschicht umschlossen ist. Sowohl der Kern als auch die Magnetitpartikel sind kristallin und nicht porös. Die Räume auf der Oberfläche des Glimmers, welche nicht von den Magnetitpartikeln besetzt ist, sind von einer dickeren Glasschicht überzogen als die Spitzen der Magnetitpartikel, so daß sich eine im wesentlichen nicht-poröse Glasoberfläche ergibt.

Die Nichtporosität der magnetischen Partikel bezieht sich nur auf die äußere Oberfläche, nicht auf das Innere des Partikels, so daß das Partikel in seinem Inneren porös sein kann, wenn die Oberfläche nur von im wesentlichen porenfreiem Glas oder einer Glasoberfläche mit Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm umschlossen ist.

Überraschenderweise sind die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel besonders vorteilhaft zur Isolierung biologischer Materialien aus Proben geeignet. Insbesondere werden lange Nukleinsäuren sehr wenig oder gar nicht zerstört, wenn sie daran immobilisiert werden. Das Material des Kerns ist darüber hinaus eine natürliche Ressource und somit ökologisch wenig bedenklich. Die Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel ist darüber hinaus sehr wenig aufwendig und kostengünstig.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche. Im Stand der Technik sind superparamagnetische Partikel beschrieben. Es hat sich
nun herausgestellt, daß ferromagnetische Partikel, wenn sie mit einer Glasoberfläche überzogen sind, erhebliche Vorteile bei der Isolierung von biologischen Materialien aufweisen.
Solange die ferromagnetischen Partikel noch keinem Magnetfeld ausgesetzt waren, sedimentieren sie ausschließlich unter Einfluß der Schwerkraft. Sie sind durch Schütteln einfach
und schnell wieder zu suspendieren. Der Vorgang der Abscheidung ohne Magnetfeldeinfluß
verläuft dabei bevorzugt langsamer als die Immobilisierung biologischer Materialien an ihrer
Oberfläche. Dies gilt insbesondere für Nukleinsäuren. Die ferromagnetischen Partikel
können auf einfache Weise mittels eines Magneten an einer bestimmten Stelle der Probenflüssigkeit gesammelt werden, um die Flüssigkeit von den Partikeln und somit den immobilisierten biologischen Materialien zu trennen.

Die Glasoberfläche der erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel kann porenfrei sein oder aber Poren enthalten. Aus den oben genannten Gründen für die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel ist es bevorzugt, daß die äußere Oberfläche auch der ferromagnetischen Partikel im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Auch die erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel haben bevorzugt eine Korngröße zwischen 10 und 60 μm, besonders bevorzugt 20 und 50 μm. Besonders bevorzugt sind Partikel, bei denen eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 10, besonders bevorzugt 1 nm haben. Ein Beispiel für einen erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel ist der oben genannte Verbundstoff aus Glimmer- und Magnetitpartikeln, umschlossen von einer Glasschicht.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch

- Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enhält, mit den erfindungsgemäßen magnetischen Partikeln oder den erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikeln unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und
- Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.

Unter biologischen Materialien werden Materialien auf partikulärer oder molekularer Basis verstanden. Hierzu gehören insbesondere Zellen, z. B. Viren und Bakterien aber auch humane und tierische isolierte Zellen, wie Leukozyten, sowie immunologisch aktive niederund hochmolekulare chemische Verbindungen, wie Haptene, Antigene, Antikörper und Nukleinsäuren. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, z. B. DNA oder RNA.

Proben im Sinne der Erfindung sind beispielsweise klinische Proben, wie Blut, Serum, Mundspülflüssigkeit, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Punktate und Knochenmarkproben. Die Probe kann auch aus dem Bereich der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik oder der molekularbiologischen Forschung, z. B. aus Bakterienkulturen, Phagenlysaten und Produkten von Amplifikationsverfahren, z. B. PCR, stammen.

Erfindungsgemäß haben die magnetischen Partikel einen inneren Kern, auf den die äußere Glasoberfläche aufgebracht ist. Bei dem Kern kann es sich um einen Verbundstoff, jedoch

auch um einfache Eisenkerne handeln. Der Kern kann auch aus einer kristallinen oder keramischen oder glasartigen Struktur bestehen, in die Eisenoxid eingelagert ist.

Mit dem geschilderten Verfahren kann natives oder modifiziertes biologisches Material isoliert werden. Unter nativem biologischem Material wird Material verstanden, dessen Struktur gegenüber den natürlich vorkommenden biologischen Materialien nicht irreversibel verändert wurde. Dies schließt jedoch nicht die Modifizierung anderer Bestandteile der Probe aus. Sollen beispielsweise Zellen isoliert werden, so kann zwar das die Zellen umgebende Medium modifiziert sein, nicht jedoch die Zellen als solche. Sollen Nukleinsäuren isoliert werden, so sollen auch diese in der nativen Form, d. h. nicht denaturiert, geschnitten oder durch Ankoppelung reaktiver Gruppen modifiziert sein. Der Begriff natives biologisches Material umfaßt daher insbesondere biotinylierte Nukleinsäuren nicht. Beispiele für native biologische Materialien sind Phagen-DNA oder zelluläre Nukleinsäuren aus Blut.

Modifizierte biologische Materialien umfassen Materialien, die nicht in der Natur vorkommen, z. B. Nukleinsäuren, die durch Anheftung reaktiver, nachweisbarer oder zur Immobilisierung befähigenden Gruppen modifiziert sind, z. B. biotinylierte Nukleinsäuren.

In bestimmten Fällen kann die Probe ohne Vorbehandlung in das erfindungsgemäße Isolierungsverfahren eingesetzt werden. In vielen Fällen sollte die Probe jedoch durch eine geeignete Methode aufgeschlossen und das in der Probe enthaltende biologische Material freigesetzt werden. Verfahren zum Aufschluß von Proben sind dem Fachmann bekannt und
können chemischer, enzymatischer oder physikalischer Natur sein. Auch eine Kombination
dieser Verfahren ist möglich. Beispielhaft genannt sei Lyse durch Ultraschall, Hochdruck
oder durch Scherung, durch Alkali, Detergenzien oder chaotrope Salzlösungen, oder durch
Einwirkung von Proteinasen oder Lipasen. Speziell im Hinblick auf die Aufschlußverfahren
zum Erhalt von Nukleinsäuren wird auf Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory
Manual, 2nd Addition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
und Ausubel et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Viley and Sons, NY,
verwiesen.

Die Probe kann neben dem zu isolierenden biologischen Material weitere Bestandteile, z. B. Zelltrümmer, Proteine, Salze und weitere nicht zu isolierende Stoffe in einer Flüssigkeit enthalten. Diese Probe, die bevorzugt das biologische Material in nativer Form enthält, wird unter Bedingungen, bei denen das gewünschte biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, mit den Partikeln in Kontakt gebracht. Die Bedingungen hierfür hängen von

der Art des biologischen Materials ab, sind jedoch prinzipiell bekannt. Sie richten sich auch nach der Art der Bindung, über die das biologische Material an die Oberfläche gebunden wird. Sollen beispielsweise immunologische Wechselwirkungen für die Bindung ausgenutzt werden, so müssen Bedingungen gewählt werden, die für die Bildung von Immunkomplexen geeignet sind. Für Nukleinsäuren ist im Fall der modifizierten Nukleinsäuren eine Bindung über die Gruppen der Nukleinsäuren möglich, die die Modifizierung darstellen, z. B. Biotin über die Bindung an mit Streptavidin beschichtete Oberflächen. Insbesondere bei Nukleinsäuren ist jedoch der Fall der direkten Bindung von Nukleinsäuren an Glas bevorzugt, unter anderem deshalb, weil sich eine Modifizierung der Nukleinsäuren erübrigt und schon native Nukleinsäuren gebunden werden können. Die Bindung nativer Nukleinsäuren an Glaspartikel kann analog zu Verfahren des Standes der Technik erfolgen. Bevorzugt erfolgt sie in Gegenwart chaotroper Salze, wobei die Konzentration dieser Salze zwischen 2 und 8 mol/l beträgt, bevorzugt 4 bis 6 mol/l. Bei chaotropen Salzen handelt es sich z. B. um Natriumjodit, Natriumperchlorat, Guanidininiumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorit, ist jedoch nicht auf diese Verbindungen beschränkt.

Zum Inkontaktbringen der Probe mit den Partikeln wird die Probe mit den Partikeln vermischt und für eine für die Bindung ausreichende Zeit inkubiert. Die Länge der Inkubation ist dem Fachmann in der Regel aus der Behandlung mit nicht-magnetischen Partikeln bekannt, eine Optimierung ist durch Durchführung einer Bestimmung der Menge an immobilisiertem biologischem Material an der Oberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten möglich. Für Nukleinsäuren können Inkubationszeiten zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten zweckmäßig sein.

Je nach Größe und Art der magnetischen Partikel findet schon während der Inkubationszeit eine Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt oder erhält sich die Suspension über längere Zeit. Wenn die Partikel eine sehr kleine Korngröße aufweisen und superparamagnetisch sind, erhält sich die Suspension über einen längeren Zeitraum. Handelt es sich um Partikel mit einer größeren Korngröße, so findet bereits während der Inkubation eine langsame Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt. Insbesondere wenn es sich um ferromagnetische Partikel handelt, bilden sich solche Aggregate. Für den bevorzugten Fall, daß die ferromagnetischen Partikel nicht vormagnetisiert sind, ist eine besonders schonende Separation gewährleistet.

Die Immobilisierung findet bevorzugt nicht durch Ausfällung durch Erniedrigung der Löslichkeit der zu immobilisierten Materialien statt. Stattdessen beruht die Immobilisierung auf

biospezifischen Wechselwirkungen (Fang-Moleküle) oder Adsorption. Dies vermeidet weitgehend unspezifische Einschlüsse von Verunreinigungen.

Nach der Inkubation erfolgt die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit. Dies wird allgemein durch die Separation des an die magnetischen Partikel gebundenen Materials mit Hilfe eines Magnetfeldes errreicht. Beispielsweise können die Magnetpartikel an die Wand des Gefäßes, in welchem die Inkubation stattgefunden hatte, gezogen werden. Daraufhin kann die Flüssigkeit mit den Inhaltsstoffen der Probe, die nicht an die magnetischen Partikel gebunden wurden, entfernt werden. Diese Entfernung hängt von der Art des Gefäßes ab, in dem die Inkubation stattgefunden hat. Geeignete Verfahrensschritte sind Abpipettieren oder Absaugen der Flüssigkeit.

Danach können die magnetischen Partikel gewünschtenfalls ein- oder mehrmal mit einer Waschlösung gereinigt werden. Die Waschlösung wird so gewählt, daß eine Ablösung des biologischen Materials von der Partikeloberfläche möglichst nicht stattfindet, jedoch nicht zu isolierende Verunreinigungen möglichst gut weggewaschen werden. Dieser Waschschritt findet bevorzugt durch Inkubation der Waschlösung mit den Partikeln statt, wobei bevorzugt eine Resuspension der Partikel vorgenommen wird, z. B. durch Schütteln oder Anlegung eines nicht mit dem ersten Magnetfeld identischen Magnetfeldes. Die verunreinigte Waschlösung wird bevorzugt genauso entfernt wie die Probe in dem oben genannten Schritt zur Bindung des biologischen Materials.

Im Anschluß an den letzten Waschschritt kann ein kurzer Trocknungsschritt der magnetischen Partikel im Vakuum oder durch Ausdampfen (lassen) der Flüssigkeit vorgenommen werden, wobei auch eine Vorbehandlung mit Aceton möglich ist.

Das so gereinigte biologische Material kann, falls gewünscht, von den magnetischen Partikeln entfernt werden. Auch dieser Schritt richtet sich nach der Art der Bindung des biologischen Materials an die magnetischen Partikel. Für den Fall, daß es sich bei dem biologischen Material um native Nukleinsäuren und bei den magnetischen Partikeln um glasüberzogene Partikel handelt, kann die Nukleinsäure mittels eines Elutionspuffers mit niedrigem Salzgehalt von den erfindungsgemäßen Partikeln entfernt werden. Solche Puffer sind aus DE 3724442 und Analytical Biochemistry 175, 196-201 (1988) bekannt. Als Elutionspuffer mit niedrigem Salzgehalt werden insbesondere Puffer mit einem Gehalt von weniger als 0,2 mol/l eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der



Elutionspuffer Tris. In einer anderen besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Elutionspuffer um entmineralisiertes Wasser.

In einer weiteren Ausführungsform kann das beschriebene Reinigungs- und Isolierungsverfahren im Anschluß an eine immunomagnetische Separation von Zellen (z. B. virale Partikel oder prokariontische bzw. eukariontische Zellen) aus einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe erfolgen. Hierzu wird die Probe mit magnetischen Partikeln, an welche ein Antikörper gegen ein Antigen auf der Zelle immobilisiert ist, z. B. unter Schütteln inkubiert. Solche Partikel können erfindungsgemäße Partikel sein, aber auch käufliche (z. B. MACS Microbeads der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD). Nach Anlegen eines Magnetfeldes erfolgen ein oder mehrere Waschschritte mit einer salzhaltigen Waschlösung. Man erhält Partikel, an welche die gewünschten Zellen gebunden sind. Schließlich werden die gebundenen Zellen in einem salzhaltigen Puffer resuspendiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser salzhaltige Puffer eine chaotrope Salzlösung, so daß die in der Zelle vorhandenen Nukleinsäuren aus den Zellen freigesetzt werden.

Durch Kombination der oben beschriebenen Isolierung von Zellen mit der ebenfalls beschriebenen Isolierung von Nukleinsäuen, bevorzugt in ihrer nativen Form, an den erfindungsgemäßen magnetischen Partikeln, ergibt sich ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus zellhaltigen Proben. Vorteil dieser Ausführungsform ist die mögliche Einfachheit (Single-Tube-Methode), hohe Sensitivität (besonders wichtig in der medizinischen Mikrobiologie und Onkologie) und die leichte Automatisierbarkeit.

Die als Folge der erfindungsgemäßen Verfahren isolierten biologischen Materialien können nun in beliebiger Weise weiter verwendet werden. Beispielsweise können sie als Substrat für verschiedene enzymatische Reaktionen verwendet werden. Im Falle der Nukleinsäuren seien als Beispiel die Sequenzierung, die radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung, die Amplifikation einer oder mehrerer in ihr enthaltender Sequenzen, die Transkription, die Hybridisierung mit markierten Sondennukleinsäuren, die Translation oder die Ligation genannt. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit sehr einfach ist. Im Stand der Technik wurde zur Separierung von Glaspartikeln von Verunreinigungen entweder ein Zentrifugationsschritt angewandt, oder im Falle der Bindung des biologischen Materials an Glasfiberfilter die Flüssigkeit durch diese Flüssigkeit gesaugt. Hierbei handelt es sich um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung von großen Probenzahlen behindert.

Mit den erfindungsgemäßen Partikeln ist eine effektivere Abtrennung der biologischen Materialien von Verunreinigungen möglich. Insbesondere können Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen erfindungsgemäß in besonders gutem Umfang entfernt werden. Die Ausbeute an biologischem Material ist vergleichsweise hoch. Eine Fraktionierung langer Nukleinsäuren wurde nicht beobachtet. Die erfindungsgemäßen Partikel sind bevorzugt schneller magnetisierbar.

In Figur 1 ist schematisch eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer zellhaltigen Probe gezeigt.

In Figur 2 ist die Austrennung erfindungsgemäß isolierter Nukleinsäuren in einem Agarosegel gezeigt.

In Figur 3 ist die Auftrennung von Reaktionsprodukten nach erfindungsgemäßer Isolierung und PCR-Amplifikation dargestellt.

In Figur 4 ist ein Gel der Ergebnisse aus Beispiel 4 gezeigt.

In Figur 1 ist eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer zellhaltigen Probe schematisch dargestellt. Die Probe (Specimen), welche Zellen enthält, wird probenspezifisch so vorbehandelt, daß die Zellen, in denen die Nukleinsäuren nachgewiesen werden sollen, in geeigneter Form vorliegen. Hierzu gehört z. B. bei Proben, welchen Körperflüssigkeiten entnommen wurden, die Zugabe von Reagenzien, z. B. zur Verflüssigung von zähflüssigen Proben, z. B. Speichelproben. Der so vorbereiteten Probe wird in einem Gefäß ein an eine Festphase, bevorzugt an eine Perle (Bead) gebundener Antikörper zugegeben, welcher die Zelle erkennen und binden kann. Als geeignete Partner für den Antikörper haben sich beispielsweise Antigene auf der Zelloberfläche erwiesen. Die Spezifität des Antikörpers kann sich nach der Spezifität der zu lösenden Analyseaufgabe richten. Wenn es sich bei der Festphase um die Wand des Gefäßes handelt, werden die Zellen direkt an die Wand gebunden. Für den Fall, daß es sich bei den Festphasen um eine Perle handelt, werden diese durch geeignete Separationsmethoden von der Flüssigkeit separiert. Dies kann beispielsweise durch Filtration geschehen. Im Falle von magnetischen Perlen ist eine Abtrennung durch Anlegen eines Magnetfeldes an die Außenwand des Gefäßes möglich. Die separierten Zellen werden mit einer Flüssigkeit gewaschen, um Verunreinigungen, welche den Nachweis stören würden, mit dem die Zellen umgebenden Medium zu entfernen. Bevorzugt werden Bedingungen eingesetzt, bei denen die Zellen weder von der Festphase gelöst noch zerstört werden. Anschließend findet die Zerstörung der Zellen statt, die sogenannte Lyse. Eine Möglichkeit ist durch die Behandlung der Zellen mit chaotropen Salzen gegeben. Andere Möglichkeiten sind die Einwirkung von Proteinasen und Detergenzien.

Zu der Lysemischung werden in der bevorzugten Ausführungsform die erfindungsgemäßen Partikel zugegeben. Nach einer geeigneten Einwirkungszeit, die über die Beladung der Oberfläche mit Nukleinsäuren optimiert werden kann, werden die Partikel von der sie umgebenden Flüssigkeit, die weitere und nicht nachzuweisende Zellbestandteile enthält, getrennt. Dies geschieht wiederum bevorzugt durch Anlegen eines magnetischen Feldes mittels eines Magneten an der Gefäßwand.

Um eventuell noch anhaftende Verunreinigungen zu entfernen, wird bevorzugt mit einer Flüssigkeit gewaschen, die so ausgewählt wird, daß die zu bestimmenden Nukleinsäuren sich nicht von der Glasoberfläche ablösen. Zur Entfernung der Nukleinsäuren von der Glasoberfläche wird ein sogenannter Elutionspuffer zugegeben, der Reagenzbedingungen aufweist, unter denen sich die Nukleinsäuren von der Glasoberfläche lösen. Dies sind insbesondere Niedrigsalzbedingungen. Je nach beabsichtigter Weiterbehandlung der Nukleinsäuren kann die Flüssigkeit nun von den Partikeln getrennt und weiterbearbeitet werden. Es ist bevorzugt, diese Abtrennung bei anliegendem Magnetfeld vorzunehmen, so daß die Partikel separiert vorliegen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1

Herstellung der erfindungsgemäßen magnetischen Partikel

Es wurden 6 verschiedene Sole verwendet. Die Herstellung der Sole wurde nach folgenden

Sol 1 (SiO₂: $B_2O_3 = 7:3$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt. 86,6 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 14,1 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von +37,8 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

Sol 2 (SiO₂: $B_2O_3 = 4:1$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt. 100,5 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 16, 3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 25,6 ml Trimethyl-

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

Sol 3 (SiO₂: $B_2O_3 = 85:15$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt. 107,8 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 17,5 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 19,4 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von + 17,5 ml 0,15 M HCl

Sol 4 (SiO₂: $B_2O_3 = 4:1; 2 \text{ Mol}\% P_2O_5$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt. 100,5 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+25, 6 ml Trimethylborat

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

- + 16,3 ml 0,15 M HCl
- + 1,63 g P₂O₅

Sol 5 (SiO₂: $B_2O_3 = 4:1 \text{ Mol}\% \text{ Al}_2O_3$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rührem durchgeführt. 100,5 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 16,3 ml 0, 15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+25,6 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

- + 16,3 ml 0,15 M HCl
- +3,06 g AlCl₃

Sol 6 (SiO₂:B₂O₃ = 4:1 Mol% ZrO₂):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt. 100,5 ml Tetraethylorthosilicat

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

- + 25,6 ml Trimethylborat
- + 5,15 ml Zirkon(IV)-proylat, 70 Gew.% Lsg in 1-Propanol Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von + 16,3 ml 0,15 M HCl

Nach weiteren 2 Stunden bei 50 °C wurde in jeweils 150 ml der Sole 22,5 g Iriodin 600 (Black Mica) eingerührt und anschließend mit einem Sprühtrockner (Büchi 190, Mini Spray Dryer) beschichtet. Die Düsentemperatur des Sprühtrockners betrug 134 °C.

Das durch den Sprühtrockenprozeß erhaltene Pulver wurde anschließend einer Temperaturbehandlung unter Stickstoffatmosphäre (90 l/h) unterzogen. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug hierbei 1 k/min und die Haltezeit betrug 2 Stunden bei der Verdichtungstemperatur. Diese Temperatur lag bei der Beschichtung mit Sol 1 bei 750 °C, bei der Beschichtung mit Sol 2 bei 860 °C und bei den übrigen Beschichtungen bei 800 °C. Nach dem Sinterprozeß wurde der Ofen abgeschaltet und das Pulver auf Raumtemperatur abgekühlt. Eventuell entstandene Agglomerate wurden mit einem 50 μm Sieb ausgesiebt.

Beispiel 2

Herstellung von GMP1, GMP2, GMP3 und GMP4

GMP1, GMP2, GMP3 und GMP4 sind Pigmente aus unterschiedlichen Herstellungs-Chargen, die aus Sol 1 aus Beispiel 1 in einem Prozeß nach Beispiel 1 unter folgenden Bedingungen erhalten wurden:

BEST AVAILABLE COP

Parameter ·	GMP 1	GMP 2	GMP 3	GMP 4
Alterung des Sols (h) (30°C)	36	36	36	36
Pigmentanteil des Sols (g/100 ml)	5	15	8	20
Luftstrom der Düse (%)	100	100	100	100
Luftdruck (bar)	6	6	6	3
Düsentemperatur (°C)	135	120	130	143
Verdichtungstemperatur (°C)	534	534	534	615
O2-Nachbehandlung (1 Stunde)	(300°C)	(300°C)	300°C)	
Ausbeute an Pigment	niedrig	hoch	mittel	(400°C)
DNA-Ausbeute	niedrig	hoch	hoch	hoch hoch

Beispiel 3

PCR Probenvorbereitung aus humanen Vollblut mit magnetischen Glaspartikeln

Isolierung der Nukleinsäure

Von drei Glasmagnetpartikel-Chargen (GMP2 - 4) wurden je ca. 10 mg in Eppendorf Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die genauen Einwaagen sind in Tabelle 1 angegeben, es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Zu je 200 µl aufgetautem Vollblut wurden 40 µl Proteinase K (20 mg/ml, hergestellt aus Lyophilisat) pipetiert und sofort gemischt. Anschließend wurden 200 µl Bindepuffer (6 M Guanidin-HCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM Harnstoff, 30 % Triton X-100, pH 4,4) zugegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl i-Propanol wurde für 10 Sekunden auf dem Vortex-Mischer gemischt, die Probe für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abermals für 10 Sekunden wie vor gemischt. Die Magnetseparation erfolgte für wenigstens 30 Sekunden im Magnetpartikelseparator von Boehringer Mannheim (Id.-Nr. 1 641 794). Der Überstand wurde abgenommen und wie weiter unten beschrieben analysiert.



Die Magnetpartikel wurden mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer (20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C), 80 % Ethanol) durch 10 Sekunden mischen, 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Sekunden mischen gewaschen und mit dem Magnetpartikelseparator an die Gefäßwand gezogen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Waschprozedur wurde wiederholt bis der Waschüberstand farblos war (insgesamt 4 x Waschen). Nun wurden die Nukleinsäuren 3 x mit jeweils 200 µl auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch 10 Sekunden mischen, 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Minuten mischen eluiert.

Aufarbeitung des Überstandes

Der Überstand nach der 1. Bindung an die magnetischen Glaspartikel wurde folgendermaßen auf Gehalt an Nukleinsäuren überprüft: Der Überstand wurde in ein Filter-Tube (Boehringer Mannheim, Id.-Nr. 1744003, z.B. enthalten in *High Pure* PCR Product Purification Kit) gegeben und für 1 Minute bei 8000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und das Filter-Tube 2 x mit 500 µl Wasch-Puffer gewaschen (Zentrifugation wie vor). Das Filter-Tube wird kurz trocken zentrifugiert und dann mit 2 x 200 µl auf 70°C vorgewärmten 1 x Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation eluiert.

Analyse der Eluate und des Probenüberstandes

50 μ l der Eluate bzw. der über Filter-Tube aufgearbeiteten Überstände wurden mit 10 μ l Proben-Puffer versetzt und davon 45 μ l in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V für 90 Minuten aufgetrennt.

Verschieden Verdünnungen der Eluate bzw. der aufgearbeiteten Überstände wurden bei 260 und 280 nm in einem Uvikon 710 (Kontron) spektroskopisch vermessen.

Zwei 5 µl Aliquots der Eluate wurden als Doppelbestimmung durch Expand™ Long Template PCR (Boehringer Mannheim, Id.-Nr. 1681834) mit spezifischen Primern für das menschliche tPA-Gen (erwartete Produktlänge 15 kb) überprüft.

Mix I	pro Ansatz	Mix II	pro Ansatz
dNTP, je 100 mM	1 μ1	Expand™ Puffer, 10 x	
Primer 1, 200 ng/µl	l μl	Expand TM Polymerase	0,75 µl
Primer 2, 225 ng/µl	1 μl	H ₂ O, bidest.	19,25 µl
H ₂ O, bidest.	17 μΙ		, p.
	20 μl	_	25 μΙ

Mix I wird in ein dünnwandiges PCR-Tube vorgelegt mit 5 μ l Eluat versetzt und Mix II zugegeben. Der Ansatz wird kurz gemischt und mit 30 μ l Minearalöl überschichtet. Die Ansätze werden in einem Perkin-Elmer Thermocycler 9600 mit folgenden Programm amplifiziert:

2 Minuten	92°C	
10 Sekunden 30 Sekunden 12 Minuten	92°C 65°C 68°C	10 Zyklen
10 Sekunden 30 Sekunden 12 Minuten + 20 Sekunden pro Zyklus	92°C 65°C 68°C	20 Zyklen
7 Minuten anschließend	68°C 7°C	

Die 50 µl PCR Ansätze wurden mit 10 µl Proben-Puffer versetzt und davon 45 µl in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V für 90 Minuten aufgetrennt.

Ergebnisse

	260	Oberstand	1:8			1. Eluat			
	260 nm	280 nm	Aus- beute	260/28	260	280	1:8 Aus-	260/28	
GMP/2 12 mg 1	0,021	0,013	1,7 μg	1,6	nm	nm	beute	0	
10 mg 2 9 mg 3	0,045 0,036	0,035 0,027	3,7 µg	1,3	0,171 0,137	0,164 0,138	13,7 μg 11,0 μg	1,0	
GMP/3 10 mg 1	0,050	0,042	2,9 μg 4,0 μg	1,3	0,153	0,164	12,2 μg	1,0 0,9	
10 mg 2 10 mg 3	0,033	0,022	2,6 μg	1,2 1,5	0,245 0,397	0,246 0,398	19,6 µg	0,9	
GMP/4 10 mg 1	0,042	0,030 0,056	3,4 μg 0,7 μg	1,4	0,278	0,398	31,8 μg 22,2 μg	1,0 0,9	
11 mg 2 10 mg 3	0,071	0,142	2,4 μg	1,2 0,5	0,135 0,140	0,142	11,0 µg	1,0	
	0,066	0,051	1,7 μg	1,3	0,140	0,142 0,130	11,2 μg 10,4 μg	1,0	
		2 121	• •				<u> </u>	1,0	

									1,0	
		_	2. Eluat	1:8			3.	1:4		
(C) (T) (T)		260 nm	280 nm	Aus- beute		260	Eluat 280	Aus-	260/28	
GMP/2	1	0,099	0,101	7,9 µg	1,0	0,057	nm	beute	0	Eluate
GMP/3	$\frac{2}{3}$	0,078 0,103 0,147	0,076 0,112 0,147	6,2μg 8,2 μg	1,0 0,9	0,037 0,041 fehlt	0,062 0,049	2,3 µg 1,6 µg	0,9 0,8	23,9 μg 18,8 μg
GMP/4	2 3 1	0,256 0,147 0,106	0,252 0,143 0,108	11,8 μg 20,5 μg 11,8 μg	1,0	0,084 0,042 0,073	0,098 0,043 0,093	3,4 μg 1,7 μg 2,9 μg	0,9 1,0	34,8 μg 54,0 μg
	2 3	0,111 0,135	0,108 0,114 0,141	8,5 μg 8,9 μg 10,8 μg	1,0 1,0 1,0	0,083 0,054 0,077	0,098 0,063 0,095	3,3 μg 2,2 μg 3,1 μg	0,8 0,8 0,9 0,8	36,9 μg 22,8 μg 22,3 μg 24,3 μg
										_47,J μg

Tabelle 1: Ausbeute an Nukleinsäuren mit magnetischen Glaspartikeln aus 200 µl Blut

Die 1. Eluate waren noch leicht gelb gefärbt und teilweise mit feinen Magnetpartikeln kontaminiert.

Die Analyse der Eluate im Agarosegel (FIG. 2) zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Ausbeute. Die Magnetpartikel GMP/2 - 4 zeigen keine signifikanten Unterschiede. In den Eluaten 1 (oben) und 2 (unten) ist etwa die gleiche Nukleinsäurekonzentration vorzufinden (vom Gel geschätzt). Eluat 3 zeigt nur noch eine geringe Nukleinsäurekonzentration. In den Überständen ist ebenfalls nur eine geringe Nukleinsäurekonzentration zu beobachten.

Die Expand™ PCR liefert mit allen Proben, bis auf wenige Ausreißer (Tabelle 2), durchweg gute und spezifische Amplifikationsprodukte. Mit den magnetischen Glasbeads ließen sich aus humanen Blutproben Nukleinsäuren isolieren, die in einer anschließenden PCR spezifische Amplifikate lieferten.

BEST AVAILABLE COP

		15 kb Expan	nd™ PCR	humanes tI	PA Gen
		1. E	luat	2. J	Eluat
GMP/2	1	fel	ılt	+	+
	2	+	+	+	+
	_3	+	+	fe	hlt
GMP/3	1	+	+	+	+
	2	(+)	+	+	+
	3		(+)	+	+
GMP/4	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	(+)*
	_3	+	+	fe	hlt
K, BM Kontroll DN	NA.				

Tabelle 2. Ergebnisse Expand™ PCR

In FIG. 3 ist ein Gel mit den Reaktionsprodukten nach PCR-Amplifikation gezeigt. MWM III ist ein Molekulargewichtsmarker (Eluat 1, oben; Eluat 2, unten).

Beispiel 4

Bindung von DNA-Längenstandard an magnetische Glaspartikel

1. Vorbereitung der magnetischen Glaspartikel

Von der Glasmagnetcharge GMP4 wurden 12 mg in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt.

2. Lyse und Bindung

In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 12 mg magnetischen Glaspartikeln werden 900 μ l Lysis-Puffer (4.6 M GuSCN, 45 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,3) und 100 μ l DNA-Probe, in der modellhaft DNA-Längenstandard III von Boehringer Mannheim (Katalog-Nr. 528552) eingesetzt wurde, 2 bis 10 sec. gemischt, bis eine homogene Suspension entsteht. Die Lösung wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei alle 5 min gemischt wird.

Die Magnetseparation erfogt für mindestens 15 sec in einem Magnetpartikelseparator. Der Überstand wird abpipettiert.

^{* 3.} Eluat

3. Waschen und Trocknen

Die magnetischen Glaspartikel werden zweimal mit Waschpuffer (5.2 M GuSCN, 50 mM Tris, pH 6.5) zweimal mit 70% vorgekühltem Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen, indem das Magnetfeld entfernt, 800 µl Lösung zupipettiert, 2 sec gemischt, 1 min bei RT inkubiert, das Magnetfeld angelegt und der Überstand schließlich abpipettiert wird.

Nach Entfernung des Acetons werden die Partikel 10 min bei 56 °C im Heizblock bei offenem Deckel getrocknet.

4. Elution der DNA

Die DNA wird mit 4x 50µl Elutionspuffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) eluiert, indem 10 min unter mehrmaligem Schütteln bei 56°C inkubiert wird und der DNA-haltige Überstand schließlich in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert wird.

5. Analyse der Eluate

Ein Fünstel des Eluatvolumens wurde mit Probenpusser versetzt und die DNA auf einem 1 %igen Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Recovery wurde eine Verdünnungsreihe von DNA-Längenstandard III auf das gleiche Gel aufgetragen, die die in den Proben zu erwartenden DNA-Mengen enthält.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Scannen eines Polaroidphotos des Agarosegels. Hierbei wurde die Verdünnungsreihe des Standards als Kalibrator verwendet.

BEST AVAILABLE COP

Die Ausbeute an DNA mit magnetischen Glaspartikeln ist in Tabelle 1 dargestellt

Standar Nr.	DNA - Menge im Stan dard [ng]	Helligkeitsintens. Standard (Meßwert) [rel.Einheiten]	Probe Nr	Pigment/ Bead-Typ	Helligkeitsintens. Probe (Meßwert) [rel.Einheiten]	errechnete DNA- Menge auf Gel [ng]	errechnete DNA- Menge in Probe [ng]	Recovery [%]
1	200	65	1	GMP4	45	139	695	69,5
2	175	56	2	GMP4	39	120	600	60,0
3	150	51	!					00,0
4	125	44						
5	100	37						
6	75	25						
7	50	17			•			
8 .	25	9						
9	10	4						
					•			

Tabelle 1. Ausbeute an DNA-Längenstandard III mit magnetischen Glaspartikeln

Das Agarosegel, das als Grundlage für die quantitative Auswertung diente, ist in FIG. 4 dargestellt. Es handelt sich um ein 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Spur 1 bis 10 entspricht einer Verdünnungsreihe von DNA-Längenstandard III. 1: 1 µg DNA, 2: 200 ng DNA, 3: 175 ng DNA, 4: 150 ng DNA, 5: 125 ng DNA, 6: 100 ng DNA, 7: 75 ng DNA, 8: 50 ng NDA, 9: 25 ng DNA, 10: 10 ng DNA.

Spur 11 und 12 entspricht der von den magnetischen Glaspartikeln eluierten DNA bei Einsatz von 200 ng DNA-Längenstandard.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

(B) STRASSE: Sandhoferstr. 116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

(F) POSTLEITZAHL: 68298

(G) TELEFON: 0621 759 4348

(H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Magnetisches Pigment

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTR□GER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

34

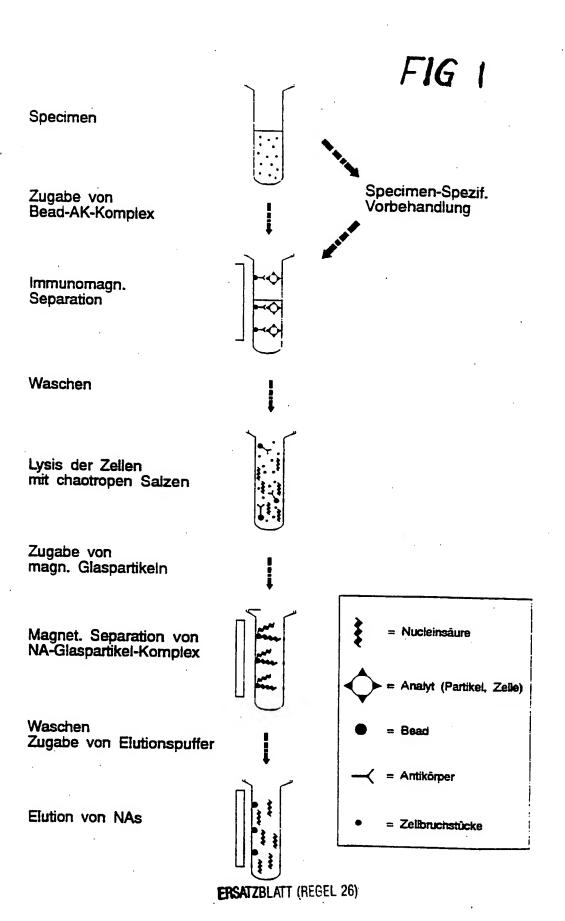
ACTGTGCTTC TTGACCCATG GCAGAAGCGC CTTC	34
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare (B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"	
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	

CCTTCACTGT CTGCCTAACT CCTTCGTGTG TTCC

Patentansprüche

- Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist.
- Ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche.
- Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Korngröße von zwischen 10 und 60 μm haben.
- Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 1 nm haben.
- Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen Verbundstoff aus einem Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei dieser Verbundstoff von einer Glasschicht umschlossen ist.
- 6. Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch
 - Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enthält, mit Partikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und
 - Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.
- Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem biologischen Material um Nukleinsäuren handelt.
- 8. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch
 - Inkontaktbringen einer Probe, welche die Nukleinsäure in nativer Form in einer Flüssigkeit enthält, mit magnetischen Partikeln mit Glasoberflächen unter Bedingungen, bei denen die Nukleinsäuren in nativer Form an die Glasoberfläche binden können und
 - Abtrennung der gebundenen Nukleinsäuren von der Flüssigkeit.

- Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung mit Hilfe eines Magneten geschieht.
- Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel beim Inkontaktbringen mit der Probe nicht vormagnetisiert sind.
- 11. Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel durch
 - Bereitstellung eines magnetischen Kernes und
 - Umschließen des magnetischen Kernes mit einer im wesentlichen porenfreien Glasoberfläche.
- 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Umschließen die Abscheidung eines Sols auf der Oberfläche und das anschließende Verdichten des Sols beinhaltet.
- 13. Verwendung ferromagnetischer Glaspartikel zur Isolierung von Nukleinsäuren in nativer Form.



l μg λ DNA V38/2

V38/3

V38/4

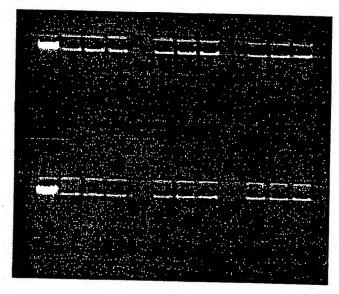


FIG 2

MWM III V38/2 | V38/3 | V38/4 | 2 3 1 2 3

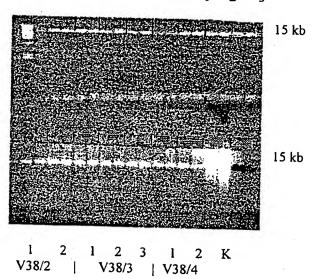
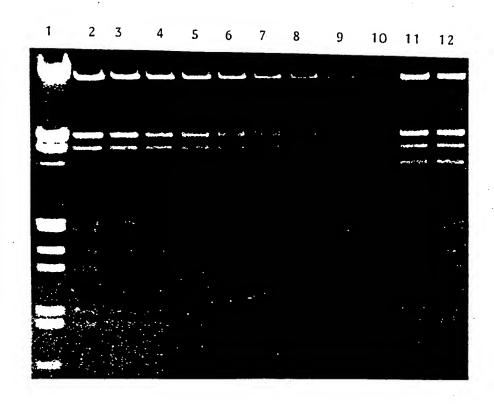


FIG 3

BEST AVAILABLE COP

FIG 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten anal Application No
PCT/EP 96/02459

		PCT	/EP 96/02459
A. CLAS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H21/00		
According	to International Passes Classification (IDC)		
	to International Patent Classification (IPC) or to both national classics S SEARCHED	fication and IPC	
Minimum	documentation searched (classification system followed by classification)	ion symbols)	
IPC 6	C07H		
Document	ation searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in	the fields searched
Electronic	data base consulted during the international search (name of data bas	e and, where practical, search to	erms used)
	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the re	elevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,O 343 934 (ALCAN INT LTD) 29	November	1-7,9-13
	see the whole document		
X	DE,A,43 07 262 (BERGEMANN CHRISTI September 1994 see the whole document	AN) 8	1-7,9-13
Χ		•	
^	GB,A,2 116 206 (KMS FUSION INC) 2 September 1983 see the whole document		1-5,11
Y	WO,A,88 06633 (ARNOLD LYLE JOHN J NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MAR September 1988 see page 18, line 21 - line 27; e 1,2	K ALA) 7	1-13
	-	/	
X Furt	I ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members	are listed in annex.
Special ca	tegories of cited documents:	To later document published aft	er the international Glin - day
conzo	ent defining the general state of the art which is not lered to be of particular relevance document but published on or after the international	or priority date and not in o	conflict with the application but ciple or theory underlying the
L docum	date ent which may throw doubts on priority claim(s) or	X° document of particular relevended cannot be considered novel involve an inventive stem who inventive stem w	vance; the claimed invention or cannot be considered to nen the document is taken alone
citatio	n or other special reason (as specified)	Y document of particular relev	ance the daimed invention
outer		encountering to companied with	olve an inventive step when the one or more other such docu- ing obvious to a person skilled
P' docum later t	ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	in the art. document member of the say	
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the intern	
1	1 October 1996	0 5. 11. 96	•
Name and I	mailing address of the ISA	Authorized officer	
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bardili, W	
DCT464	/210 /mared charatt / fully 10023		

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten nal Application No

C.(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PCT/EP 9	6/02459
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		
			Relevant to claim No.
Y	US,A,4 554 088 (WHITEHEAD ROY A ET AL) 19 November 1985 see the whole document		1-13
Y	ANAL. BIOCHEM., vol. 175, 1988, pages 196-201, XP002015369 W. PYERIN ET AL.: "Filter-Supported Preparation of Phage DNA" cited in the application see the whole document	·	1-13
Y	NUCLEIC ACIDS RES., vol. 22, 1994, pages 4543-4, XP002015370 T.L. HAWKINS ET AL.: "DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase" see the whole document		1-13
	. *		
		i.	
			4
		•	
		ļ	
	,		
			•

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. mal Application No PCT/EP 96/02459

_	1	rci/Er	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0343934	29-11-89	AT-T- 117829 DE-D- 68920778 DE-T- 68920778 ES-T- 2066851 JP-A- 2038318 US-A- 5039559	15-02-95 09-03-95 18-05-95 16-03-95 07-02-90 13-08-91
DE-A-4307262	08-09-94	NONE	
GB-A-2116206	21-09-83	US-A- 4448884 CA-A- 1191096 FR-A- 2522678 JP-C- 1306775 JP-A- 58165787 JP-B- 60030510 SE-B- 455310 SE-A- 8301015	15-05-84 30-07-85 09-09-83 13-03-86 30-09-83 17-07-85 04-07-88 04-09-83
WO-A-8806633	07-09-88	AT-T- 107654 AU-A- 1426988 DE-D- 3850273 DE-T- 3850273 EP-A- 0281390 ES-T- 2054797 JP-T- 1502319 KR-B- 9600479	15-07-94 26-09-88 28-07-94 29-09-94 07-09-88 16-08-94 17-08-89 08-01-96
US-A-4554088	19-11-85	CA-A,C 1254028 DE-A- 3485332 EP-A- 0125995 EP-A- 0357593 JP-B- 7006986 JP-A- 60001564 JP-A- 8009995 W0-A- 8806632 US-A- 4628037 US-A- 4695392 US-A- 4695393 US-A- 4698302 US-A- 4672040	16-05-89 23-01-92 21-11-84 14-03-90 30-01-95 07-01-85 16-01-96 07-09-88 09-12-86 22-09-87 22-09-87 06-10-87 09-06-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. nales Aktenzeichen

		. Intern. nales Aktenzeichen		
			PCT/EP 96	/02459
A. KLASS IPK 6	IFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07H21/00			***
11110	CO/1121/00			
	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen l	Klassifikation und der II	PK	
	RCHIERTE GEBIETE			
IPK 6	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssym CO7H	ibole)		
	•.			. ;
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen,			
	Managery and the second secon	soweit meze miter me re	cherchierten Gebiete	: fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank u	nd evil. verwendete	Suchhemiffe)
				outhorganic)
			•	•
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Ange	abe der in Betracht komi	nenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
····				· .
X	EP,A,O 343 934 (ALCAN INT LTD) 2	9.November		1-7,9-13
	1989 siehe das ganze Dokument	•	1	•
	stene das ganze bokument		Fe/	
X	DE,A,43 07 262 (BERGEMANN CHRIST	IAN)		1-7,9-13
	8.September 1994			- /,5 20
	siehe das ganze Dokument			
X	GB,A,2 116 206 (KMS FUSION INC)			1-5,11
	21.September 1983			1-3,11
	siehe das ganze Dokument		ŀ	·
Y	WO,A,88 06633 (ARNOLD LYLE JOHN	JR -NFISON		1-13
	NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MA	RK ALA)		1-13
•	7. September 1988	07		
	siehe Seite 18, Zeile 21 – Zeile Beispiele 1,2	2/;		
		-/		
·			·	
X Weit	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang	Patentfamilie	
* Besondere *A* Veröffe	Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,	"T" Spätere Veröffentlic oder dem Prioritäts	hung, die nach dem	internationalen Anmeldedatum worden ist und mit der
Spet II	icht als besonders bedeutsam anzusehen ist	Anmeidung nicht k	Ollidiert, sondern nu	r zumVerständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden
Anme	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist	"X" Veröffentlichung vo	n hesonderer Redem	umar die begonnnichte Euste der
	antlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhast er- en zu lassen, oder durch die das Verössentlichungsdatum einer	kaim anem amgrun	a aleser verolientic	hung night als neu oder auf
soli od ausgef	in zu lassen, over durch die das Verölfendichungsdahim einer n im Recherchenbericht genannten Veröffendichung belegt werden ler die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ibbr)	"Y" Veröffentlichung vo kann nicht als auf e	n besonderer Bedeut	tung; die beanspruchte Erfindung
O' Veroffe	unty entlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung, enutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	Veröffentlichungen	dieser Kateoorie in	einer oder mehreren anderen
P Veröffe	muchung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach	diese Verhindung für der Veröffentlichung, d	ir einen Fachmann i	naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche		internationalen Rech	
_	1 01 4 1 400		,	
1	1.0ktober 1996	0 5, 11,	96	
Name und	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Be		
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk			
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bardili	, W	
		3		

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern nales Aktenzeichen PCT/FP 96/02459

C.(Fortsetzi	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	PCT/EP 96/02459		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kon	menden Teile		
Υ		nnenden Leile	Betr. Anspruch Nr.	
1	US,A,4 554 088 (WHITEHEAD ROY A ET AL) 19.November 1985 siehe das ganze Dokument	1-13		
Y	ANAL. BIOCHEM., Bd. 175, 1988, Seiten 196-201, XP002015369	·	1-13	
: Y	Preparation of Phage DNA" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument NUCLEIC ACIDS pes			
	Bd. 22, 1994, Seiten 4543-4, XP002015370 T.L. HAWKINS ET AL.: "DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase" siehe das ganze Dokument		1-13	
	•			
İ				
			*	
			*	
ĺ	* *		·	
	•			
- 1				
	*			
1		.		
İ				
			•	
		1		
		1		
	A/210 (Fortsetzung von Blatt 3; (Juli 1992)			

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur seiben Patentfamilie gehören

Inter. males Aktenzeichen
PCT/EP 96/02459

			30/02439
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0343934	29-11-89	AT-T- 117829 DE-D- 68920778 DE-T- 68920778 ES-T- 2066851	15-02-95 09-03-95 18-05-95 16-03-95
		JP-A- 2038318 US-A- 5039559	07-02-90 13 - 08-91
DE-A-4307262	08-09-94	KEINE	
GB-A-2116206	21-09-83	US-A- 4448884 CA-A- 1191096 FR-A- 2522678 JP-C- 1306775 JP-A- 58165787 JP-B- 60030510 SE-B- 455310 SE-A- 8301015	15-05-84 30-07-85 09-09-83 13-03-86 30-09-83 17-07-85 04-07-88
WO-A-8806633	07-09-88	AT-T- 107654 AU-A- 1426988 DE-D- 3850273 DE-T- 3850273 EP-A- 0281390 ES-T- 2054797 JP-T- 1502319 KR-B- 9600479	15-07-94 26-09-88 28-07-94 29-09-94 07-09-88 16-08-94 17-08-89 08-01-96
US-A-4554088	19-11-85	CA-A,C 1254028 DE-A- 3485332 EP-A- 0125995 EP-A- 0357593 JP-B- 7006986 JP-A- 60001564 JP-A- 8009995 WO-A- 8806632 US-A- 4628037 US-A- 4695392 US-A- 4695393 US-A- 4698302 US-A- 4672040	16-05-89 23-01-92 21-11-84 14-03-90 30-01-95 07-01-85 16-01-96 07-09-88 09-12-86 22-09-87 22-09-87 06-10-87